



Effets dose et perturbations endocriniennes

Marie-Chantal Canivenc-Lavier

► To cite this version:

Marie-Chantal Canivenc-Lavier. Effets dose et perturbations endocriniennes. Cahiers de Biothérapie, 2011, 1, pp.42-55. hal-01137056

HAL Id: hal-01137056

<https://hal.science/hal-01137056>

Submitted on 30 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Effet dose et perturbations endocriniennes

MC Canivenc-Lavier, UMR Flavic, INRA DIJON

Selon la définition adoptée par l'OCDE, un perturbateur endocrinien est « un produit exogène qui cause des effets adverses à la santé d'un individu, ou à sa descendance, issus de changements dans sa fonction endocrinienne ». Ce constat de « perturbateur endocrinien » (PE) apparu dans les années 90 et fait état 1) d'une diminution de fertilité masculine et d'une augmentation de cancers hormonaux chez l'Homme depuis une cinquantaine d'années dans les pays industrialisés, et 2) des phénomènes de reprotoxicité observés parallèlement sur la faune sauvage dans les zones chimiquement polluées (1, 2, 3). Ces altérations physiologiques s'apparentent le plus souvent à des effets œstrogéniques et/ou anti-androgéniques, voire antithyroïdiens, et ont été initialement corrélés à des expositions environnementales, le plus souvent à faibles doses (4).

Cette appellation de PE englobe aujourd'hui une large gamme de composés d'origine industrielle (polluants atmosphériques, pesticides, détergents, dérivés plastiques, vernis...), cosmétiques (paraben), pharmaceutiques (hormones de synthèse, médicaments, produits vétérinaires) et naturelles (phyto-œstrogènes, mycotoxines...) ainsi que des métaux lourds (Zinc, plomb, Molybdène...) (5). Leurs interactions sur le système endocrinien sont fortement étayées par des études expérimentales *in vitro* et *in vivo*, initialement sur la base des tests réglementaires en vigueur conduisant à identifier des effets à des doses supra-physiologiques dans des conditions d'expositions aiguës ou sub-chroniques, puis sur la base de connaissances endocrinologiques et environnementales, révélant des effets délétères lors d'expositions chroniques dès de très faibles doses, pouvant descendre jusqu'au ng (6).

Dans l'objectif d'illustrer les effets de faibles et fortes doses de PE, cet article résume les particularités du système endocrinien chez les mammifères et/ou chez l'homme et expose quelques effets types observés sur la reproduction, le développement et le comportement à des composés œstrogéniques de type pesticide (Méthoxychlor, insecticides organochlorés), phyto-œstrogène (Génistéine), migrant d'emballage (bisphénol A), polluant organique persistant (dioxines PCBs), hormone de synthèse (DES, Ethinyl œstradiol), mais aussi anti-androgénique (Vinclozoline). Cette analyse souligne l'ambiguïté des effets faibles doses des xéno-hormones qui contrastent avec la notion d'hormésis en tant que réponse adaptative.

I- PE ET SYSTEME ENDOCRINIEN

I-1- Complexité du système endocrinien

L'approche des effets-doses en perturbation endocrinienne implique de bien définir le Système Endocrinien, c'est-à-dire l'ensemble des organes dont les sécrétions hormonales agissent, parfois à différentes doses, sur la plupart des autres tissus ou organes cibles (tableau 1). Parmi les organes sécréteurs, on y compte des glandes endocrines (gonades, pancréas) et des tissus qui ne présentent pas de structures glandulaires aussi individualisées comme le tissu adipeux (synthèse de leptine, d'œstrogènes), mais dont le rôle endocrine implique des connexions et des régulations entre ces différents organes *via* la circulation sanguine.

Outre les régulations endocrines verticales, de type hypothalamo-hypophysaire comme celles qui régissent la sécrétion des hormones sexuelles (figure 1a), les régulations latérales et ponctuelles au sein d'un même organe de type paracrine, autocrine et intracrine (figure 1b) suscitent une multiplicité de cibles laissant entrevoir des différences de sensibilités et de réponses physiologiques à des doses d'exposition données.

Tableau 1 : Fonctions principales des hormones chez les mammifères

Fonction	Hormones	Réponse
Reproduction	Androgènes, œstrogènes, progestérone , T3, T4 ; Hormones hypophysaires (FSH, LH, Prolactine)	Gamétogenèse, menstruations, processus de lactation et de la gestation...
Croissance et développement	Hormone de croissance ; Androgènes, œstrogènes, progestérone , T3, T4 ; glucocorticoïdes, insuline ; facteurs de croissances	Caractères sexuels II ; différenciation cellulaire et morphogénèse ; prolifération cellulaire et adipogénèse ; os muscle cerveau tissu adipeux...
Homéostasie interne	-Vasopressine, aldostérone, hormones parathyroïdiennes, prostaglandines ; T3, T4, Androgènes, œstrogènes, progestérone	Balance des électrolytes ; volume et pression artérielle, diurèse ; minéralisation osseuse, musculature
Equilibre énergétique	T3, T4, Androgènes, œstrogènes, progestérone , insuline, glucagon	Régulation du métabolisme général, glycémie, gluconéogenèse ; thermorégulation
Comportement	T3, T4, Androgènes, œstrogènes, progestérone , - leptine, insuline, CCK...	Comportement sexuel, social et alimentaire ; cognitivité ; perceptions sensorielles

Comme l'illustre le tableau 1, les hormones sexuelles, *via* leurs effets pleiotropiques contrôlent la morphogénèse, le développement et la plasticité de nombreux tissus et organes. En conséquence, les productions extra-gonadiques prennent une importance particulière vis-à-vis d'une action locale des PE au niveau d'organes non associés au système reproducteur comme la peau ou les os, lesquels sont susceptibles d'affecter l'un de ces paramètres dès lors qu'ils interfèrent, directement ou non, avec l'hormone d'intérêt.

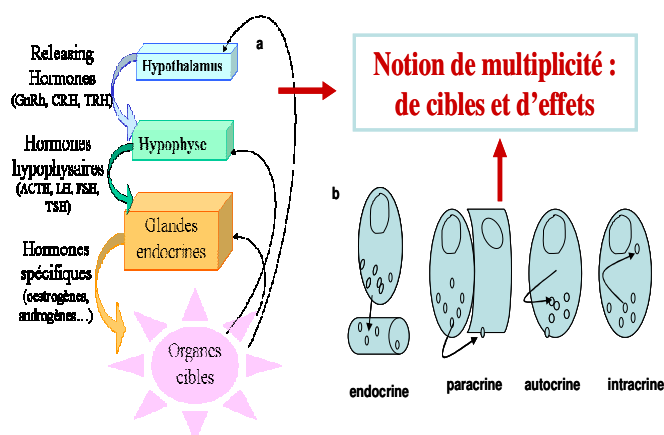


Figure 1 : Modes de régulation endocrinienne

I2- Cibles cellulaires et moléculaires des PE

Les perturbations endocriniennes résultent de différents modes d'actions des molécules, lesquels conditionnent également les effets-doses. Les interactions directes sur les récepteurs hormonaux concernent les hormones de petites tailles (PM<1000) qui sont des molécules simples (stéroïdes, T3, T4, corticoïdes,...) et donc facilement substituables par

des xénobiotiques. Dans le cas des xéno-œstrogènes par exemple, le potentiel œstrogénique, établi sur la base de l'effet utéro-trophique, est corrélé à l'affinité des molécules pour le récepteur ER alpha (tableau 2). Les xéno-œstrogènes se discriminent aussi par leur affinité à l'un ou l'autre des récepteurs alpha et beta. Parmi eux, certains se lient préférentiellement au récepteur ER alpha (hormones de synthèse, bisphénol A) et d'autres au récepteur ER bêta (phyto-œstrogènes), et même à d'autres récepteurs cellulaires (androgènes, AHR, glucocorticoïdes...), leur conférant des effets multiples à des doses différentes (7, 8).

Tableau 2 : Potentiel œstrogénique de xéno-hormones

Xéno-œstrogènes	Test Utéro-trophique
DES	100
Estrone	7
Estradiol	1
Zéranol	25. 10 ⁻²
Coumestrol	35. 10 ⁻²
DDT, Organochlorés	20. 10 ⁻²
Génistéine, Methoxychlor	10 ⁻²
Biochanine A	2,6. 10 ⁻⁴
Apigénine, BPA, Octylphénol	10 ⁻⁶
Resvératrol, Quercétine	nd
Phtalates (BBP, DEHP)	nd

Par ailleurs, outre l'affinité du PE pour chacun de ces récepteurs (œstrogènes, androgènes, etc...), le niveau et la spécificité d'expression de leurs isoformes va influencer la sensibilité de l'organe. Ainsi, alors que le ER alpha est fortement exprimé et prédomine dans l'utérus et la glande mammaire, le ER beta joue un rôle important sur le système nerveux central, cardiovasculaire et immunitaire, sur le tractus urogénital, l'os, les reins et les poumons (9). C'est ainsi que chez les rongeurs, des traitements chroniques de génistéine, à la dose de 30mg/kg/j ont un effet préventif sur la déminéralisation osseuse induite par une ovariectomie (os : ER beta) sans être utéro-trophique (utérus : ER alpha prédominant), mais ils modifient le métabolisme des œstrogènes et l'expression des récepteurs hormonaux hépatiques (10).

Les hormones de nature peptidique (PM>7000), en particulier les hormones stimulinées (LH, FSH ; TSH) et digestives (insuline, glucagon, leptine), sont également affectées par les PE, mais de manière indirecte, le plus souvent *via* la régulation de leur expression génique. Ces effets indirects sont communs à ceux de nombreux xénobiotiques sur la synthèse, le métabolisme et le transport des hormones, et d'autres cibles cellulaires dont les signaux de transduction du signal identifiés par des approches moléculaires et cellulaires, et ce pour des doses inférieures au µM (11).

Les données de la littérature montrent que l'amplitude de la réponse hormonale est fonction de la substance elle-même et de la complexité avec laquelle elle interfère sur ces différentes voies de signalisation. Cette pluralité d'effet peut aussi résulter d'autres facteurs comme la liaison aux protéines de transports plasmatiques ou une action sur les voies de synthèse parfois à l'origine d'un effet antagoniste secondaire vis-à-vis des androgènes (figure 2).

C'est pourquoi, au regard de ces cibles biologiques, des composés identifiés comme faiblement œstrogéniques sur la base du test utéro-trophique (pesée de l'organe), s'avèrent avoir des effets plus marqués au mêmes doses sur d'autres organes. Ainsi, l'analyse de paramètres histologiques (ex : cornification vaginale, épaisseur de la paroi utérine) ou cellulaires comme

l'expression de protéines marqueurs d'une régulation hormonale (récepteurs hormonaux, complément C4, lactoferrine) permettent de mettre en évidence des PE à des doses beaucoup plus faibles et compatibles à des doses environnementales et/ou alimentaires (12).

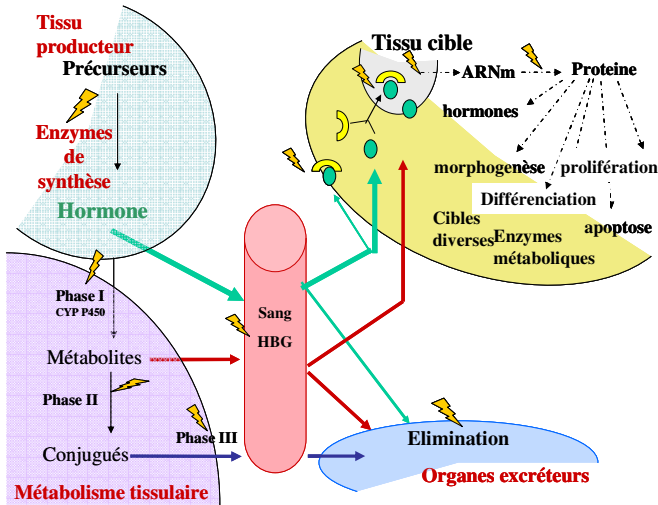


Figure 2 : points d'action des perturbateurs endocriniens. Les éclaircies indiquent les sites d'action potentiels des PE.

II- EFFETS PHYSIOLOGIQUES ET EFFETS DOSES

A l'image des hormones dont ils perturbent les équilibres, les PE sont susceptibles d'interférer sur ces cibles cellulaires qui interviennent dans divers processus biologiques en liaison avec plusieurs organes, pour certains spécifiques aux mâles (appareil reproducteur, prostate) ou aux femelles (organes reproducteurs, glande mammaire), ou aux deux (cerveau, os). Aux doses plus faibles, voire très faibles, ils peuvent exercer des effets sur des cibles plus communément impliquées dans l'homéostasie générale (développement, comportement, métabolisme général et adipogénèse, etc...).

II a- Reprotoxicité

Reprotoxicité mâle : Au cours des dernières décennies, l'altération des paramètres de reproduction mâle a été décrite chez de nombreuses espèces sauvages, mammifères ou non (13). Chez l'homme, on note plus particulièrement une augmentation de l'incidence du cancer du testicule (14), de l'hypospadias (15) et de la cryptorchidie (16) ainsi qu'une baisse significative de la qualité spermatique (17,18). Ces différentes anomalies semblent reliées entre elles (syndrome de dysgénésie testiculaire ou TDS) et témoigneraient d'un trouble du développement du testicule fœtal (19). Quelques études épidémiologiques quant à l'exposition au DES (20;21) ou à des pesticides (22) montrent qu'ils sont susceptibles d'agir dès de très faibles doses pendant la vie fœtale et d'engendrer des malformations génitales, mais aussi de modifier les équilibres hormonaux, notamment en modifiant le rapport œstrogène/androgène *in situ* à tous les stades du développement (23;24, 25). Récemment, ces effets ont pu être corrélés à des taux de contaminants allant du ng au µg /g de graisses placentaires (26). Des altérations similaires chez les rongeurs ont été obtenues après une exposition *in utero* ou périnatale à divers PE œstrogéniques (DES, bisphénol A, phyto-œstrogènes) ou anti-androgéniques (flutamide, vinclozoline, p,p'-DDE), confirmant la sensibilité de la période prénatale aux faibles doses.

Ces effets concernent également les molécules naturelles comme les phyto-œstrogènes. Les premiers constats remontent

aux années 30, où des problèmes de fertilité ont été relevés chez des animaux de rente lors d’une exposition alimentaire au cours de la gestation à des isoflavones (pâtures de trèfle ou luzerne).

La littérature confirme ces effets reprotoxiques aux doses alimentaires (1 à 10mg/kg/j) lors d’exposition précoces alors que chez l’adulte, il faut atteindre des doses 100 fois plus élevées pour obtenir des effets sur des paramètres physiologiques comme la spermatogenèse (tableau 3).

Tableau 3 : Effets reprotoxiques de la génistéine chez le rat

Exposition des mâles (rongeurs)	In utero (1mg/kg/j)	neonatale (1 à 10 mg/kg/j)	adulte >>10 mg/kg/j
Malformations	++++	atrophie testiculaire	à très fortes doses
Altérations spermatiques	++++	+++ (puberté)	+++++
hormones sérique	↓ Testo	↓ FSH (adulte)	↓ Testo
Altération comportement	+++	++++ (adulte)	

Mais à des doses inférieures, on observe cependant, des modifications hormonales comme l’inhibition de la GnRH ou de la testostérone, l’immuno-neutralisation de la FSH et de la LH. De tels effets s’expriment également sous l’action d’anti-androgènes comme la vinclozoline. Les niveaux d’expression des récepteurs aux oestrogènes (RE α et RE β) aux androgènes (RA) et à la progestérone (RP) sont également modulés à de faibles doses de PE compatibles avec des expositions environnementales, c’est-à-dire inférieures au ppm et parfois même aux doses autorisées (27;28).

Par contre, dans le cas du BPA, des expositions à des doses très faibles (du μ g au mg) en période de gestation ou de lactation chez les rongeurs n’ont généralement pas d’effet prononcé sur l’appareil reproducteur (29;30). Cependant au regard des paramètres biochimiques, certains auteurs montrent une diminution du taux de testostérone néonatale sérique, laquelle est proportionnelle aux doses de BPA circulantes (31). Des études plus approfondies montrent qu’une exposition à 60 μ g/kg/j en début de puberté diminue également la quantité de tubes séminifères (32) et qu’une exposition de 4 semaines chez la souris adulte à des composites dentaires contenant du BPA diminue le poids du testicule, la production spermatique, l’index de fertilité et augmente le poids des vésicules séminales et de la prostate (33). Or chez l’homme, plusieurs études suggèrent que l’exposition à des PE environnementaux ou alimentaires soit un des facteurs de risque vis à vis de l’apparition de cancer de la prostate à l’âge adulte (34).

Reprotoxicité femelle : Chez la femelle, la sensibilité aux xéno-oestrogènes est étroitement liée à l’activité ovarienne, et par conséquent, aux taux d’oestrogènes circulants (figure 3).

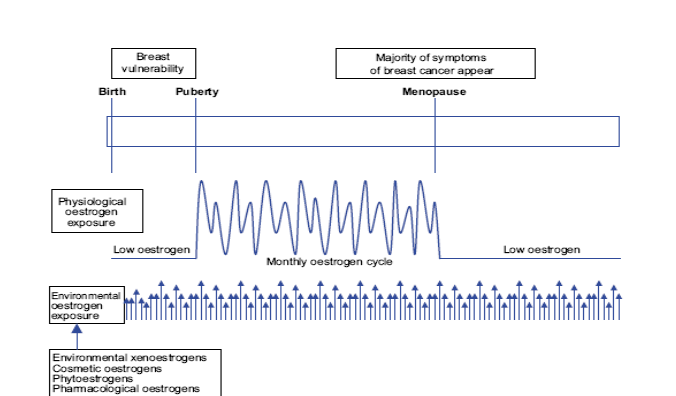


Figure 3 : Importance potentielle de la période d'exposition à des perturbateurs endocriniens environnementaux : les taux d'oestrogènes endogènes chez la femme sont élevés de la puberté à la ménopause et présentent des pics pendant les cycles menstruels qui rendent négligeables les variations apportées par l'exposition environnementale (11)

Cette sensibilité serait plus importante en l’absence d’activité, c’est-à-dire aux âges extrêmes de la vie (période utérine, prépubertaire et ménopausale) et influencerait sur le développement de certaines pathologies hormono-dépendantes (35).

L’impact de l’activité ovarienne est pris en compte par les tests réglementaires préconisés pour identifier des composés (anti)-œstrogéniques ou (anti)-androgéniques: le test utéro-trophique validé pour identifier des composés œstrogéniques (étude effet/dose) est réalisé sur des femelles immatures où adultes castrées. Comme l’illustre une étude comparative des effets de composés issus de migrants d’emballages et de flavonoïdes (figure 4) : le stade immature est plus sensible pour détecter des composés à effets hormonaux plus faibles, mais également des effets interactifs (36). A la dose d’exposition de 100mg/kg/j, seule la génistéine entraîne un léger effet utéro-trophique comparable à celui d’une dose d’œstradiol peu utéro-trophique (45 μ g/kg/j) chez l’animal immature.

Par contre, ces animaux répondent très fortement à des co-traitements de ces perturbateurs endocriniens peu actifs avec de faibles doses d’œstradiol (45 μ g/kg/j), contrairement à l’adulte. Par ailleurs, cette étude comparative montre que chez le rat immature, aucun effet interactif n’est observé entre la génistéine et l’œstradiol alors qu’une légère potentialisation de l’œstradiol est observée chez l’adulte ovariectomisée (stade qui mime le statut ménopausal). Ceci rend difficile l’établissement de règles en matière d’effets doses par des études *in vivo* qui prennent en considération la réponse que d’un seul organe.

Comme mentionné plus haut, d’autres paramètres œstrogéniques tels que des effets sur l’épaississement de la paroi utérine ou vaginale, la cornification vaginale, les taux sériques hormonaux, sont affectés à des doses inférieures à celles qui produisent un effet utéro-trophique. Ceci souligne le fait que toutes les cibles biologiques n’ont pas la même sensibilité au niveau de l’appareil reproducteur, et que certains tissus sont susceptibles d’être affectés par des PE, même au cours de l’activité ovarienne.

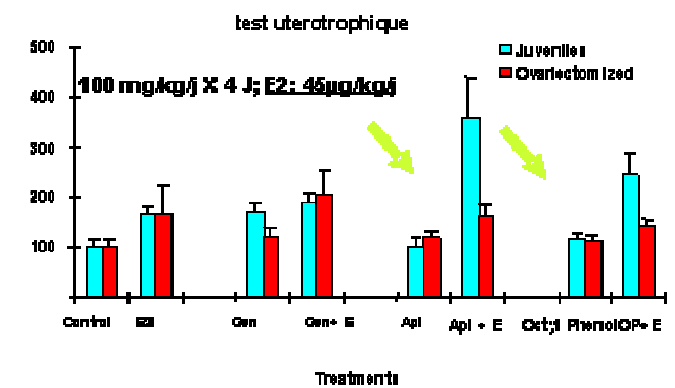


Figure 4 : Impact du statut physiologique sur la détection de composés œstrogéniques par le test utéro-trophique chez le rat Wistar (12)

D’autres études expérimentales confortent certaines études épidémiologiques quant à l’action des xéno-œstrogéniques sur le développement et la fonction de reproduction femelle. Chez l’adulte, des effets sont observés sur la durée des cycles ou sur la plasticité de la glande mammaire, et si l’on s’en réfère aux effets de la génistéine décrits dans la littérature, on retrouve cette différence de sensibilité en fonction de la date d’exposition (tableau 4). Ils soulignent encore la période utérine comme une étape critique où des effets aux faibles doses se produisent. Ces effets s’opèrent via des liaisons aux

récepteurs hormonaux (effets agonistes ou antagonistes), en modifiant la biodisponibilité des hormones, en inhibant l'aromatase ou encore en dégradant les cytochromes P450 1A et 1B impliqués dans la biodégradation des oestrogènes (37).

Tableau 4 : Reprotoxicité de la génistéine chez la femelle

Exposition des femelles	in utero (1mg/kg/j)	neonatale (1 à 10 mg/kg/j)	adulte >>10 mg/kg/j
Cycle menstruel	-----puberté précoce-----		↑ phase d'oestrus
Utérus et vagin	hypertrophie	hypertrophie	atrophie
cellules anormales	-----utérus et vagin----	/	-----vagin et ovaires-----
hormones sérique	↓ E2 et LH (puberté)	↓ FSH (adulte)	↓ LH et FSH
Aire préoptique	↑↑↑ (suggérant de possibles altérations du comportement sexuel)		

Chez l’homme, les taux élevés de phyto-œstrogènes dans l’alimentation influencent le cycle menstruel et corrigent certains symptômes de la ménopause à des doses d’exposition voisines de 1mg/kg/j, mais des effets délétères graves ne sont pas décrits. A l’inverse, dans les années 55-60, le maintien des grossesses par traitement au DES, qui est 100 milles fois plus actif que l’œstradiol, est à l’origine de malformations utérines et d’une augmentation de l’incidence du cancer du vagin chez les femmes exposées *in utero* (38).

Chez le rat, des expositions utérines en Génistéine à 50 mg/kg/j produisent une augmentation de l’incidence des cancers de l’utérus et du vagin, des anomalies du tractus génital, des altérations de la morphogenèse mammaire (39). Celles-ci sont comparables à celles produites par de faibles doses de DES (1µg) (40). De plus, à cette même dose, (1µg/kg) le DES favorise la sensibilité de l’utérus à des cancérigènes chimiques comme le DMBA (diméthylbenz(a)anthracène), un cancérigène néoformé au cours de grillades (41),. Curieusement, dans les mêmes conditions une dose de 10µg/kg de DES rend toutes les femelles stériles quelles, mais n’a pas d’effet sur l’apparition de tumeurs (42). Cette dose de 1µg s’avère particulièrement critique puisque qu’une seule injection de DES à 1µg suffit à favoriser la cancérogenèse mammaire chimio-induite par le DMBA (43). Cet effet résulte d’une modification de la morphogenèse mammaire qui se traduit par un plus fort taux de bourgeons terminaux (TEB), lesquels sont considérés comme les structures mammaires cibles des cancérigènes chimiques. (tableau 5). Comme abordé plus loin, ce type de réponse en U est obtenu avec d’autres xéno-hormones incluant les phyto-œstrogènes, et complique l’évaluation des risques liés aux expositions à des PE.

Tableau 5 : Effets doses du DES chez les rongeurs

DES	Période	Effets observés	Auteurs	
1µg/kg	J1-J5	carcinomes uterins	Newbold 2001	
1µg/kg + DMBA	J0-J5 J6-14 J0-14	displasies mammaires carcinomes + stérilité ni carcinome, ni displasies mais LH, E2 et P faibles	Yoshikawa 2008	
Dose unique				
		Glande mammaire		
		J175	J50	
		Carcinomes	nécroses nécroses TEB	
0	J0 + DMBA	50	77 0	Ninomoya 2008
0.1		54	87 40	
1µg		91	100 53	
10		39	85 93	
100		19	75 100	

Les études menées par le groupe d’Ana Soto quant aux effets du Bisphénol A sur la glande mammaire vont dans le même sens : l’exposition de souris *in utero* à de très faibles doses de bisphénol A (25µg)) entraîne une augmentation du

nombre de ces bourgeons terminaux alors qu’à forte dose (250µg), un effet inverse est observé (44). Une étude plus approfondie des effets lors d’une exposition gestationnelle à ces faibles doses leur permet de constater la présence à l’âge adulte d’une plus grande proportion de foyers pré-néoplasiques à des doses encore plus faibles (2,5µg/kg/j) (45). Les études les plus récentes indiquent des modifications dans les niveaux d’expression de gènes cibles à des doses faibles (de l’ordre du µg au mg/kg/j BPA) (46), c'est-à-dire en dessous des doses sans effets couramment admises et plus proches des conditions environnementales. Tout comme dans le cas de la génistéine et du DES, l’exposition *in utero* au BPA induit une altération précoce de la morphogenèse mammaire chez la souris et une augmentation de sécrétion dans les alvéoles après la naissance, et ce à des doses proches du ng (47). Aux faibles doses, ces trois composés ont donc des effets très semblables malgré leurs différents degrés d’affinité pour les récepteurs des hormones stéroïdiennes.

Les androgènes peuvent aussi jouer un rôle crucial dans l’homéostasie mammaire, notamment comme antagonistes des effets proliférateurs des œstrogènes (48). De même, l’exposition à des mélanges de xéno-hormones peut conduire à des effets additifs sur la morphogenèse mammaire : les effets d’un mélange Génistéine-Metoxychlor, deux composés œstrogéniques, incorporés dans le régime (500 à 800ppm) sont identiques à ceux obtenus avec une exposition à plus faible doses (10µg/kg/j, ip) de mélanges complexes en composés organochlorés et la Génistéine (49, 50).

Ces études soulignent l’impact morphogénétique des œstrogènes et des androgènes mais aussi le fait que des expositions à des mélanges de composés œstrogéniques et/ou anti-androgéniques puissent avoir des effets plus marqués aux très faibles doses. De plus, ces composés interagissent avec une multiplicité des voies de signalisation impliquant différents récepteurs, comme en témoignent de récentes études montrant la liaison du BPA au récepteur orphelin ERRγ (51) et l’induction de désordres métaboliques chez l’Homme (52).

II-b Adipogénèse et Métabolisme général

Depuis une dizaine d’année, plusieurs scientifiques avancent l’effet de doses environnementales de PE sur la genèse de l’obésité et voient là un lien avec des perturbations métaboliques et une action l’adipogenèse (53, 54). Cette hypothèse s’appuie entre autre sur l’effet du Diethylstilbestrol (DES) lors d’expositions prénatales à faibles doses sur les nouveaux-nés : ceux-ci, de taille normale à la naissance, développent une masse adipeuse supérieure à l’âge adulte. A l’inverse, des expositions à fortes doses réduisent le poids à la naissance sans compensation à l’âge adulte (rat, homme).

Les effets des PE sur le tissu adipeux sont également démontrés à de faibles doses d’exposition et diffèrent selon les xéno-hormones. Plusieurs données convergent pour considérer le BPA comme un composé pro-adipogénique. *In vitro*, les travaux de Masuno et al. (55) montrent que le BPA favorise, dès la faible dose 2µg/ml (10µM), la différenciation des pro-adipocytes de souris (3T3L1) et l’accumulation de lipides en combinaison avec l’insuline. Dès 1µM, il augmente le transport de glucose régulé par l’insuline dans les adipocytes en culture (56). Des études à plus fortes doses (100µM) identifient un effet sur la synthèse de triglycérides et de leptine, suggérant aussi une possible action sur le comportement alimentaire (57). Ces effets à faibles doses sont en lien avec une régulation via les récepteurs aux œstrogènes (58). *In vivo*, ces effets à faibles doses (1-10µg/l d’eau de boisson) s’expriment lors d’expositions précoces (gestation, lactation) et se traduisent pas un effet sur la masse adipeuse des

animaux à l'âge adulte (59). A l'inverse, la Génistéine inhibe la différenciation adipocytaire, l'accumulation de lipides et la prolifération cellulaire (57). *In vivo*, la Génistéine, à des doses alimentaires (500-1000ppm soit une exposition de l'ordre de 20mg/kg/J) diminue également la prise alimentaire, le poids corporel et la masse grasse chez des souris ovariectomisées (60). Corrélativement, elle augmente la lipolyse dans ces cellules ainsi que dans des adipocytes de rat (61,62).

Les données sur l'impact des œstrogènes sur ce processus font l'objet de plusieurs revues récentes qui soulignent encore la vulnérabilité de la période d'exposition néonatale (63). A ces mêmes doses d'exposition, des effets de type œstrogénique ont aussi été observés lors d'une exposition périnatale à des phyto-œstrogènes ou des pesticides sur la mobilisation fonctionnelle du tissu adipeux mais également sur des préférences gustatives et sur la prise alimentaire chez le rat (64,65).

II-c- Comportement (alimentaire, social, sexuel)

Les altérations du comportement sont associées à des altérations neuronales ou à des altérations des perceptions sensorielles (66). Ces perceptions diffèrent naturellement en fonction du sexe, de l'âge, du statut hormonal et de l'état de santé et conditionnent le comportement dans sa globalité, incluant le comportement sexuel, social et alimentaire (67, 68). Comme l'illustre le tableau 3, les effets obtenus lors d'expérimentations animales chez le rongeur se produisent à des doses d'expositions compatibles aux doses environnementales ou alimentaires, et pour des périodes d'expositions précoces (gestation, lactation). Ces effets concernent également les préférences vis-à-vis des odeurs et des saveurs : une exposition précoce à de faibles doses de PE peut altérer le dimorphisme sexuel vis-à-vis des préférences de solutions sucrées et salées (37). Il est intéressant de noter que ces effets s'opèrent avec des composés œstrogéniques (génistéine), mais également anti-androgéniques (vinclozoline) (69, 70, 71). Ces mêmes études font état d'effets sur la prise alimentaire qui sont à relier aux effets des œstrogènes sur la libération stomacale de la CCK, hormone de la satiété, mais aussi de la leptine, hormone du tissu adipeux impliquée dans la prise alimentaire.

Ces effets comportementaux résultent également d'actions directes sur le système nerveux central. Dans le cas du BPA, ces effets s'opèrent dès de très faibles doses sur le comportement social (jeu, éveil, hyperactivité, agressivité, etc), en particulier lors d'expositions précoces (72, 73) et concernent plusieurs cibles cellulaires : il agit au niveau des récepteurs à la stomatostatine (74) et inhibe la tyrosine-hydroxylase dès la dose de 25ng/jour chez la souris (75).

Tableau 6 : Effets de PE sur le comportement

Molécule	Dose	Traitement	Effet adulte	Référence
DCHP	0.87 à 87nmol	Post Natal 5 ^{ème} Jour	Hyperactivité	Ishido et al. 2004
TCDD	0.2µg/kg	Gestation 15 ^{ème} J	Sociabilité	Markowski et al. 2002
	0.1 µg/kg/j	Gestation 10-16 ^{ème} J	Cognitivité gout amer, gras	Widholm et al. 2003 Tuomisto et al. 2000
	0,025 à 0,1µg/kg/j	Gestation +lactation	Préférence du sucré	Amin et al. 2000
	2µg/kg/j	Gestation 11 ^{ème} J	Comportement sexuel, F1et F2	Wolf et al; 1999
BPA	40µg/kg/j	G0-J21	Comportement sexuel et social	Dessi-Fulgheri et al. 2002
	400 µg/kg/j	G14-J6		
Vinclozoline	200 mg/kg	J2-3	jeu (mâles)	Hotchkiss et al. 2003
	0.8-60mg/kg	G7-J77	sucré/ activité	Flynn et al. 2001
génistéine	2-20 et 100mg/kg	7 ^{ème} J gestation à l'âge adulte	sociabilité salé	Flynn et al 2000

Dans le même sens , les travaux de Hany (76) concernant l'action d'exposition précoces en hydrocarbures polycycliques sur le comportement montrent que ces effets portent sur plusieurs cibles dont l'aromatase cérébrale, mais également les taux sériques d'œstradiol, de testostérone et de LH. Ils sont souvent associés à une action sur le développement de l'appareil reproducteur. Toutefois, il est important de noter que cette étude identifie aussi des effets lors d'une exposition à des cocktails de xeno-œstrogènes à très faibles doses (5µg/kg/j) plus marqués que ceux obtenus avec un xéno-œstrogène de référence l'Aroclor 1234 à la dose de 40mg/kg/j. Cette spécificité des faibles doses sur le comportement est également remarquée dans les travaux de Wisniewski et al. lors d'une exposition perinatale avec la génistéine : alors qu'elle affecte peu ou pas ces mêmes paramètres développementaux à la dose de 300ppm, elle exerce un effet significatif sur la plupart des paramètres lorsqu'elle est incorporée à faible dose (5ppm) dans le régime (77).

Dans le cas des hormones sexuelles, quelles que soient les espèces, leur perturbation altère le dimorphisme sexuel observé sur de nombreux organes et sur l'expression des caractères sexuels secondaires, lesquels constituent des biomarqueurs d'exposition. Les différences de sensibilité liées à l'âge, la dose, l'organe, mais aussi au mode de régulation endocrinienne *in situ* sont autant de facteurs susceptibles d'expliquer des différences de réponses en fonction de la dose. Prises dans leur ensemble, ces quelques données illustrent l'action spécifique des perturbateurs endocriniens sur le comportement à des doses compatibles avec les doses d'expositions environnementales et alimentaires, et pointent une nouvelle fois les périodes gestationnelles et lactationnelles comme des périodes sensibles aux plus faibles doses.

III- PE ET FAIBLES DOSES

III-1- Courbes de réponse en U

Les effets des PE en fonction de la dose se traduisent bien souvent par des réponses non monotoniques qui méritent une attention particulière. A l'image des œstrogènes ou des androgènes, le PE peuvent induire des réponses effets-doses selon des courbes en U ou en U inversé: c'est en particulier le cas du DES, des phyto-œstrogènes et du BPA. (78, 79). Ces études révèlent ainsi des effets biologiques à des concentrations de l'ordre du nM, donc proches des taux circulants et souvent inférieures aux NOAEL. Le type de réponse varie selon les cibles biologiques, mais aussi selon les organes. Ainsi, l'utérus est un organe pour lequel les effets œstrogéniques (utérutrophie, expression génique) sont proportionnels à la dose de traitement alors que les effets morphométriques œstrogéno-régulés de la glande mammaire répondent selon une courbe en U (80). Ces réponses de type non monotoniques s'observent aussi lors d'exposition prénatales (ex : BPA et bourgeons acinaires terminaux dans la glande mammaire). Elles peuvent concerner des cibles moléculaires précises comme l'expression de l'aromatase (81). Ces différences de sensibilité sont à relier à leur multiplicité d'effets.

III-2 PE et multi-exposition

Des perturbations hormonales sont observées sous l'action de très faibles doses de mélanges de xeno-hormones. L'injection de très faibles doses de DES, inefficaces par elles-mêmes, à des rats nouveau-nés, provoque des altérations du développement génital en présence d'anti-androgènes (82). Des anomalies de la reproduction mâle ont été identifiées lors

d'une exposition chronique à des doses de Génistéine et de Vinclozoline de 1mg/kg/j de la conception à l'âge adulte (83). A ces mêmes doses, des approches « omiques » identifient des effets délétères sur la condensation et l'organisation de la chromatine spermatique (84). Cette étude souligne également des effets plus importants lors de la combinaison des molécules.

D'autres travaux rapportent des interactions entre phyto-œstrogènes (isoflavones, hydroxy-flavonoïdes) et xéno-œstrogènes (BPA, Ethynil œstradiol, pesticides), avec des effets reprotoxiques parfois plus marqués que ceux issus d'une exposition aux molécules seules (85, 86, 87, 88). Des effets neurophysiologiques et comportementaux sont également décrits avec des mélanges de POPs aux faibles doses (89). Ces effets majorés concernent diverses régulations hormonales et sont obtenus lors d'expositions à des cocktails de xéno-œstrogènes (90) et/ou d'anti-androgènes (91, 92) dans des conditions expérimentales compatibles avec des «multi-expositions» *via* l'alimentation, l'environnement ou encore la thérapeutique (pansements dentaires, hormonothérapie, contraception).

CONCLUSION :

En résumé, ces données soulignent des différences de sensibilité en fonction de la fenêtre d'exposition, et pointent en particulier la période immature et néonatale comme une période particulièrement critique et sensible aux faibles doses . Les études de multi-expositions identifient des interactions qui suscitent un certain questionnement scientifique en raison des conditions d'expositions multiples auxquelles l'homme est confronté, soit *via* l'alimentation, qui peut contenir des traces de plusieurs contaminants (pesticides, migrants d'emballages, etc...), soit *via* l'environnement (polluants atmosphériques, polluants aquatiques). Ces effets majorés lors d'expositions aux faibles doses et/ou à des mélanges laissent entrevoir les risques émergents liés aux bioaccumulations au cours de la chaîne alimentaire et aux expositions via la gestation ou le lait maternel. Cet état des connaissances amène au constat de la difficulté de développer des outils toxicologiques pertinents pour l'identification précoce de ce type de composés par des tests appropriés aux très faibles doses, mais aussi aux expositions multiples.

Cependant, la difficulté de cette analyse réside dans la disparité des modes d'administration qui n'ont pas été relevés ici : per os, intra-péritonéal etc., lesquels peuvent interférer sur le mode d'action des molécules et sur l'efficacité de la dose. D'autre part, pour un mode d'administration donné, la relation entre la dose et l'effet se doit d'être pondérée compte tenu des facteurs individuels ou environnementaux qui vont moduler les réponses. Ainsi en est-il des variabilités liées au sexe, à l'âge, à l'état physiopathologique ou aux caractéristiques génétiques des individus exposés. En tout état de cause, on note des effets différents aux faibles doses, ainsi qu'à des réponses selon des courbes U qui invitent à être prudent sur l'interprétation ou l'extrapolation des études effets/doses. Dans le cas des PE, les effets faibles doses diffèrent le plus souvent de ceux observés aux fortes doses et peuvent être fortement délétères ; ceci est en désaccord avec la notion usuelle de l'hormésis en médecine ou en biologie, qui définit l'hormésis comme une réponse adaptative des cellules à un stress modéré consécutif à une exposition des organismes à des doses modérées.

Références

- ¹ Patisaul HB and Adewale HB., Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behaviour. *Front Behav. Neurosci.* 2009; 3:10.
- ² Guillette LJ Jr, Crain DA, Rooney AA and Pickford DB. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ Health Perspect* 1995; 103 Suppl 7:157-64.
- ³ Guillette LJ et Gunderson MP. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction* (2001);122, 857-864
- ⁴ Louis J. Guillette, Jr., and Thea M. Edwards, .Environmental influences on fertility: can we learn lessons from studies of wildlife?. *Fertility and Sterility*, 2008, 89, Suppl1, e21-e24.
- ⁵ Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT, Foster PM, Gray CL, Gray LE. Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go, *Toxicol Sci.* 2008;105(2):235-59
- ⁶ Bermanke J, Köhler HR. The impact of environmental chemicals on wildlife vertebrates, *Rev Environ Contam Toxicol.* 2009;198:1-47
- ⁷ Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998;139(10):4252-4263.
- ⁸ Strobecker T, Picard K, Lhuguenot JC, Canivenc-Lavie MC, Chagnon MC Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol.* 2004;42(6):887-897.
- ⁹ Gustafsson JA. Novel aspects of estrogen action *J Soc Gynecol Investig.* 2000;7(1 Suppl):S8-S9
- ¹⁰ Phrakonkham P, Chevalier J, Desmetz C, Pinnert MF, Bergès R, Jover E, Davicco MJ, Bennetau-Pelissero C, Coxam V, Artur Y, Canivenc-Lavie MC. Isoflavonoid-based bone-sparing treatments exert a low activity on reproductive organs and on hepatic metabolism of estradiol in ovariectomized rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;224 (2):105-15..
- ¹¹ Brevini TA, Zanetto SB, Cillo FE Effects of endocrine disruptors on developmental and reproductive functions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2005;5(1):1-10.
- ¹² Tansey G, Hughes CL Jr, Cline JM, Krümmner A, Walmer DK, Schmoltzer S. Effects of dietary soybean estrogens on the reproductive tract in female rats *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998 ; 217(3):340-344.
- ¹³ Toppari J. Is semen quality declining? *Andrologia.* 1996 Nov-Dec;28(6):307-308.
- ¹⁴ Adami HO, Bergström R, Möhner M, Zatoński W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M, et al. Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer.* 1994 1;59(1):33-38.
- ¹⁵ Paulozzi LJ, Erickson JD, Jackson RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics.* 1997; 100(5):831-834.
- ¹⁶ Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update.* 2001 May-Jun;7(3):282-286.
- ¹⁷ Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992 Sep 12;305(6854):609-613.
- ¹⁸ Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M, Jouannet P. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod.* 2001;16(12):2710-2717.
- ¹⁹ Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.* 2001;16(5):972-978..
- ²⁰ Swan SH. Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: long-term effects in humans. *APMIS.* 2000;108(12):793-804..
- ²¹ Klip H, Verloop J, van Gool JD, Koster ME, Burger CW, van Leeuwen FE; OMEGA Project Group. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet.* 2002 359(9312):1102-7.
- ²² Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, Georget V, Paris F, Jeandel C, Lumbroso S, Nicolas J . Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;178(1-2):99-105.
- ²³ Sharpe RM. The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab.* 1998;9(9):371-377.
- ²⁴ Gray LE Jr, Ostby J, Monosson E, Kelce WR. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat *Toxicol Ind Health.* 1999 48-64.
- ²⁵ Monosson E, Kelce WR, Lambright C, Ostby J, Gray LE Jr. Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol Ind Health.* 1999;65-79
- ²⁶ Fernandez MF, Olmos B, Granada A, López-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez JM, Cruz M, Olea-Serrano F, Olea N. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect.* 2007;115 Suppl 1:8-14.
- ²⁷ Kelce WR, Lambright CR, Gray LE Jr, Roberts KP Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;142(1):192-200.
- ²⁸ Williams K, Fisher JS, Turner KJ, McKinnell C, Saunders PT, Sharpe RM. Relationship between expression of sex steroid receptors and structure of the seminal vesicles after neonatal treatment of rats with potent or weak estrogens. *Environ Health Perspect.* 2001;109(12):1227-1235.
- ²⁹ Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, Seely JC, Dimond SS, Van Miller JP, Shiotsuka RN, Beyer D, Hentges SG, Waechter JM Jr. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci.* (2008) 104, 362-384.
- ³⁰ Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Wilson VS, Ryan BC, Gray LE Jr. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol Sci.* 2008, (102) 371-382.
- ³¹ Tanaka M, Nakaya S, Katayama M, Leffers H, Nozawa S, Nakazawa R, Iwamoto T, Kobayashi S. Effect of prenatal exposure to bisphenol A on the serum testosterone concentration of rats at birth. *Hum Exp Toxicol.* 2006, (25), 369-373
- ³² Okada K, Kai O. Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. *Asian J Androl.* 2008, (10), 271-272
- ³³ Al-Hiyasat AS, Darmani H. In vivo effects of BISGMA-a component of dental composite-on male mouse reproduction and fertility. *J Biomed Mater Res A.* 2006;(78):66-72.
- ³⁴ Prins GS. Endocrine disruptors and prostate cancer risk *Endocr Relat Cancer.* 2008 (3):649-56.
- ³⁵ Darbre P.D. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism ;* 2006; 20, (1), pp. 121-143
- ³⁶ Strobecker T, Chagnon MC, Pinnert MF, Berges R, Canivenc-Lavie MC. Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol.* 2003;17(4):421-32

³⁷ Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J*. 2000;347(Pt 2):321-37..

³⁸ Swan SH. Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: long-term effects in humans APMIS. 2000; 108(12):793-804.

³⁹ Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res*. 2001; 61(11):4325-8

⁴⁰ Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Haseman J Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. *Reprod Toxicol*. 2004, 18(3):399-406.

⁴¹ Yoshikawa T, Kawaguchi H, Umekita Y, Souda M, Gejima K, Kawashima H, Nagata R, Yoshida H. Effects of neonatally administered low-dose diethylstilbestrol on the induction of mammary carcinomas and dysplasias induced by 7,12-dimethylbenz [a] anthracene in female rats. In *Vivo*. 2008 Mar-22(2):207-13.

⁴² Kawaguchi H, Umekita Y, Souda M, Gejima K, Kawashima H, Yoshikawa T, Yoshida H. Effects of neonatally administered high-dose diethylstilbestrol on the induction of mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in female rats. *Vet Pathol*. 2009;46(1):142-50.

⁴³ Ninomiya K, Kawaguchi H, Souda M, Taguchi S, Funato M, Umekita Y, Yoshida H. Effects of neonatally administered diethylstilbestrol on induction of mammary carcinomas induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene in female rats. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(6):813-8.

⁴⁴ Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod*. 2001; 65(4):1215-23.

⁴⁵ Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol*. 2007, 23(3):383-90.

⁴⁶ Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol*. 2006, (254-255): 179-86

⁴⁷ Warri A, Saarinen NM, Makela S, Hilakivi-Clarke L. The role of early life genistein exposures in modifying breast cancer risk. *Br J Cancer*. 2008 ;98(9):1485-93.

⁴⁸ Brettes JP, Mathelin C. [Dual effects of androgens on mammary gland] *Bull Cancer*. 2008 10;95(5):495-502.

⁴⁹ Wang XJ, Bartolucci-Page E, Fenton SE, You L.. Altered mammary gland development in male rats exposed to genistein and methoxychlor. *Toxicol Sci*. 2006;91(1):93-103.

⁵⁰ Foster WG, Younglai EV, Boutross-Tadross O, Hughes CL, Wade MG. Mammary gland morphology in Sprague-Dawley rats following treatment with an organochlorine mixture in utero and neonatal genistein. *Toxicol Sci*. (2004);77(1):91-100.

⁵¹ Okada A, Kai O. Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. *Asian J Androl*, 2008 (10), 271-276

⁵² Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults JAMA. (2008) ;300(11):1303-–10

⁵³ Newbold, RR, Padilla-Banks E., Snyder RJ, Phillips TM, and Jefferson WN 2007 Developmental Exposure to Endocrine Disruptors and the Obesity Epidemic *Reprod Toxicol*. 2007b; 23(3): 290–296.

⁵⁴ Tabb MM, Blumberg B.New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol*. 2006 20(3):475-82.

⁵⁵ Masuno H, Kidani T, Sekiya K, Sakayama K, Shiosaka T, Yamamoto H, Honda K.Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J Lipid Res*. 2002; 43(5):676–84.

⁵⁶ Sakurai K, Kawazuma M, Adachi T, Harigaya T, Saito Y, Hashimoto N, Mori C.Bisphenol A affects glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes. *Br J Pharmacol*. 2004; 141(2):209-14.

⁵⁷ Phrakonkham P, Viengchareun S, Belloir C, Lombès M, Artur Y, Canivenc-Lavier MC. Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;110(1-2):95-103.

⁵⁸ Chen JQ, Brown TR, Russo J. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochim Biophys Acta*. 2009 1793(7):1128-43.

⁵⁹ Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol A increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb*. 2007; 14(5):245-652.

⁶⁰ Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich WG, Cooke PS. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology*. 2003 ; 144(8):3315-3 »20.,

⁶¹ Harmon AW, Harp JB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol*. (2001) 280(4):C807-813.

⁶² Kandulski K, Nogowski L, Szkudelski T. Effect of some phytoestrogens on metabolism of rat adipocytes. *Reprod Nutr Dev*. (1999)39(4):497-501.

⁶³ Heindel JJ, vom Saal FS. Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2009. 304(1-2):90-96.

⁶⁴ Lephart ED, Setchell KD, Handa RJ, Lund TD. Behavioral effects of endocrine-disrupting substances: phytoestrogens. *ILAR J*. 2004.45(4):443-454..

⁶⁵ Flynn et al. Behavioral responses of rats exposed to long-term dietary vinclozolin. *J Agric Food Chem* 2001, (49):1658-1665

⁶⁶ Panzica GC, Mura E, Miceli D, Martini MA, Gotti S, Viglietti-Panzica C. Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally relevant neural circuits in higher vertebrates. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1163:271-278.

⁶⁷ Morley. Decreased food intake with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001, 56:81-88

⁶⁸ Curtis KS, Davis LM, Johnson AL, Therrien KL, Contreras RJ. Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiol Behav*. 2004; (80):657-664.

⁶⁹ Slikker et al. Gender-based differences in rats after chronic dietary exposure to genistein. *Int J Toxicol* 2001, 20:175-179

⁷⁰ Flynn KM, Ferguson SA, Delclos KB, Newbold RR Effects of genistein exposure on sexually dimorphic behaviors in rats. *Toxicol Sci*. 2000;55(2):311-319.

⁷¹ Flynn et al. Behavioral responses of rats exposed to long-term dietary vinclozolin. *J Agric Food Chem* 2001, 49:1658-1665

⁷² Farabolini F, Porrini S, Della Seta D, Bianchi F, Dessì-Fulgheri F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect*. 2002 ;110 Suppl 3:409-414

⁷³ Dessì-Fulgheri F, Porrini S, Farabolini F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on play behavior of female and male juvenile rats. *Environ Health Perspect*. 2002;110 Suppl 3:403-407.

⁷⁴ . *Environ Health Perspect*. 2002 Jun;110 Suppl 3:397-402 Facciolo RM, Alò R, Madeo M, Canonaco M, Dessì-Fulgheri F. Early cerebral activities of the environmental estrogen bisphenol A appear to act via the somatostatin receptor subtype sst(2).

⁷⁵ Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology*. 2006 Aug;147(8):3681-91. Epub 2006 May 4

⁷⁶ Hany J, Lilienthal H, Sarasin A, Roth-Härer A, Fastabend A, Dunemann L, Lichtensteiger W, Winneke G ; Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999 ;158(3):231-243

⁷⁷ Wisniewski AB., Cernetich A, Gearhart JP., Klein SL. Perinatal exposure to genistein alters reproductive development and aggressive behavior in male mice. *Physiology & Behavior* 84 (2005) 327–334

⁷⁸ Witorsch R.J. Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature. *Food and Chemical Toxicology* 2002 40 : 905–912

⁷⁹ . Almstrup K, Fernández MF, Petersen JH, Olea N, Skakkebaek NE, and Leffers H. Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves. *Environ Health Perspect*. 2002 ; 110(8): 743–748.

⁸⁰ Wadia PR., Vandenberg LN., Schaeberle CM., Rubin BS., Sonnenschein C, and Soto AM. Perinatal Bisphenol A Exposure Increases Estrogen Sensitivity of the Mammary Gland in Diverse Mouse Strains *Environmental Health Perspectives* 115 (4): 592-598

⁸¹ Anderson J.M. Andrade, Simone W. Grande, Chris E. Talsness, Konstanze Grote, Ibrahim Chahoud A dose–response study following *in utero* and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): Non-monotonic dose–response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 227 (2006) 185–192

⁸² Rivas A, Fisher JS, McKinnell C, Atanassova N, Sharpe RM. Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the androgen-estrogen balance. *Endocrinology*. 2002;143(12):4797-4808.

⁸³ Eustache F., Lesaffre C., Canivenc MC, Jouannet P., Cravedi JP, Auger J. 2003. Effets d’une exposition à la Vinclozoline et à la Génistéine de la gestation à l’âge adulte sur la fonction de reproduction du rat Wistar mâle: protocole et résultats préliminaires. *Andrologie* (2):170-178

⁸⁴ Auger J, Lesaffre C, Bazire A, Schoevaert-Brossault D, Eustache F. High-resolution image cytometry of rat sperm nuclear shape, size and chromatin status. Experimental validation with the reproductive toxicant vinclozolin. *Reprod Toxicol*. 2004; 18(6):775-783.

⁸⁵ Smith CC, Taylor HS . Xenoestrogen exposure imprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development. *FASEB J*. 2007. 21(1):239-246.

⁸⁶ Phrakonkham P, Chevalier J, Desmetz C, Pinnert MF, Bergès R, Jover E, Davicco MJ, Bennetau-Pelissier C, Coxam V, Artur Y, Canivenc-Lavier MC. Isoflavonoid-based bone-sparing treatments exert a low activity on reproductive organs and on hepatic metabolism of estradiol in ovariectomized rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; 224(2):105-115.

⁸⁷ van Meeuwen JA, van den Berg M, Sanderson JT, Verhoef A, Piersma AHEstrogenic effects of mixtures of phyto- and synthetic chemicals on uterine growth of prepubertal rats. *Toxicol Lett*. 2007 ;170(2):165-176.

⁸⁸ Metzdorff SB, Dalgaard M, Christiansen S, Axelstad M, Hass U, Kiersgaard MK, Scholze M, Kortenkamp A, Vinggaard AM Dysgenesis and histological changes of genitals and perturbations of gene expression in male rats after in utero exposure to antiandrogen mixtures. *Toxicol Sci*. 2007; 98(1):87-98.

⁸⁹ Desaulniers D, Cooke GM, Leingartner K, Soumano K, Cole J, Yang J, Wade M, Yagminas A. Effects of postnatal exposure to a mixture of polychlorinated biphenyls, p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, and p,p'-dichlorodiphenyldichloroethene in prepubertal and adult female Sprague-Dawley rats. *Int J Toxicol*. 2005. 24:111-127

⁹⁰ Silva E, Scholze M, Kortenkamp A . Activity of xenoestrogens at nanomolar concentrations in the E-Screen assay. *Environ Health Perspect*. 2007;115 Suppl 1:91-97.

⁹¹ Christiansen S, Scholze M, Axelstad M, Boberg J, Kortenkamp A, Hass U. Combined exposure to anti-androgens causes markedly increased frequencies of hypospadias in the rat. *Int J Androl*. 2008; 31(2):241-248.

⁹² Hass U, Scholze M, Christiansen S, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Metzдорff SB, Kortenkamp A. Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environ Health Perspect*. 2007;115 Suppl 1:122-128.